

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4430—2023

香石竹斑驳病毒的检测
荧光定量PCR法

Detection of carnation mottle virus—Real-time fluorescent PCR method

2023-12-22 发布

中华人民共和国农业农村部 发布



前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由农业农村部种植业管理司提出并归口。

本文件主要起草单位：云南省农业科学院花卉研究所、云南农业大学、中国农业大学、云南云科花卉有限公司、玉溪云星生物科技有限公司、国家观赏园艺工程技术研究中心、农业农村部花卉产品质量监督检验测试中心(昆明)、云南省花卉育种重点实验室、云南省花卉工程技术研究中心、云南省花卉标准化技术委员会、昆明市花卉遗传改良重点实验室。

本文件主要起草人：瞿素萍、张艺萍、刘冠泽、王丽花、王继华、杨秀梅、高俊平、杨春梅、许凤、张丽芳、马男、苏艳、邹凌、蒋亚莲、单芹丽、莫锡君。



香石竹斑驳病毒的检测 荧光定量 PCR 法

1 范围

本文件规定了香石竹斑驳病毒(carnation mottle virus, CarMV)的荧光定量 PCR 检测方法。

本文件适用于香石竹(*Dianthus caryophyllus*)栽培品种的种苗、植株及其他组织中香石竹斑驳病毒的检测和判定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

外壳蛋白基因 coat protein gene

编码病毒外壳蛋白的基因,可作为病毒检测的靶标,简称 *cp* 基因。

3.2

TaqMan 探针 TaqMan probes

一种检测寡核苷酸的荧光探针,其 5' 末端携带荧光基团(如 FAM、TET、VIC、HEX 等),3' 端携带淬灭基团(如 TAMRA、BHQ 等)。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CarMV: 香石竹斑驳病毒(Carnation mottle virus)

Ct 值: 每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数(cycle threshold)

DEPC: 焦炭酸二乙酯(diethy pyrocarbonate)

dNTPs: 脱氧核苷三磷酸混合液(deoxynucleoside triphosphate mixture),由 4 种脱氧核糖核苷酸 dATP、dGTP、dTTP、dCTP 等量混合而成的溶液

PCR: 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction)

Tris: 三(羟甲基)氨基甲烷[tris (hydroxymethyl)aminomethane]

5 香石竹斑驳病毒的基本信息

香石竹斑驳病毒属番茄丛矮病毒科(Tombusviridae)麝香石竹斑驳病毒属(Carmovirus)典型成员。详细信息见附录 A。

6 原理

利用香石竹斑驳病毒 *CP* 基因的高度保守区域的一段 130 bp 序列设计实时荧光引物和探针,根据香石竹斑驳病毒的实时荧光 PCR 检测结果对香石竹斑驳病毒进行检测鉴定。

7 仪器和设备

7.1 实时荧光定量 PCR 仪。

- 7.2 电泳仪。
- 7.3 凝胶成像系统。
- 7.4 超微量紫外可见分光光度计。
- 7.5 高速冷冻离心机;离心力 12 000 *g* 以上。
- 7.6 超低温冰箱:−80 °C。
- 7.7 冰箱:2 °C~4 °C, −20 °C。
- 7.8 微量移液器:量程分别为 0.1 μL~2.5 μL、0.5 μL~10 μL、5 μL~20 μL、10 μL~100 μL、20 μL~200 μL、100 μL~1 000 μL。
- 7.9 电子天平:感量为 0.01 *g*。
- 7.10 生物安全柜:洁净度 100 级以上。
- 7.11 超净工作台:洁净度 100 级以上。

8 试剂与耗材

除非另有规定,在检测中仅使用分析纯或生化试剂;所有试剂均用无 RNA 酶的容器分装;实验用水符合 GB/T 6682 的二级水指标,其中涉及 PCR 扩增的用水应符合 GB/T 6682 一级水指标。

- 8.1 dNTPs:浓度为 2.5 mmol/L。
- 8.2 DEPC 处理的灭菌纯水。
- 8.3 引物:
 - 正向引物:5'-CGGATAGTCTTGTCAACATACGG-3';
 - 反向引物:5'-CCTTATCGTTGCTTGCCTGT-3';
 - TaqMan 探针:5'-FAM-AAGGCTGACACTGTGGTGGGCGA-BHQ1-3'。
- 8.4 裂解液:含 4.0 mol/L 硫氰酸胍、0.2 mol/L 醋酸钠、25 mmol/L 乙二胺四乙酸、1.0 mol/L 醋酸钾和 2.5% (*m/V*) PVP-40。
- 8.5 去蛋白液:含 3 mol/L 硫氰酸胍、0.021 7 mol/L Tris-HCl 和 50% (*V/V*) 无水乙醇。
- 8.6 漂洗液:含 17 mmol/L NaCl、1.6 mmol/L Tris-HCl 和 80% (*V/V*) 无水乙醇。
- 8.7 荧光 PCR 扩增混合液:含有 Taq DNA 聚合酶(5U/μL)、5'-引物和 3'-引物、TaqMan 探针等的混合液。
- 8.8 RNA 提取吸附柱及套管。
- 8.9 可用于荧光 PCR 的 8 联管及盖子。

9 样品制备与存放

9.1 样品制备

样品制备过程中应戴一次性灭菌手套,所使用的工具也应灭菌处理。取样品的叶片或花瓣剪碎后置于自封袋中。样品制备时,应同时设立阳性对照、阴性对照及空白对照。其中,阳性对照为已知携带香石竹斑驳病毒的样品,阴性对照已知无香石竹斑驳病毒的样品,空白对照用无菌一级水代替样品。

9.2 样品存放

制备好的样品保存于 2 °C~8 °C 且不宜超过 24 h;中长期保存应置于−80 °C 的超低温冰箱,避免反复冻融且保存时间不宜超过 1 年。

10 检测步骤

10.1 总 RNA 提取与质量判定

10.1.1 总 RNA 提取

取 $n+3$ 个 2 mL 无 RNA 酶的离心管,其中 n 为检测样品数、1 管阳性对照、1 管阴性对照、1 管空白

对照,对每个管进行编号,并在生物安全柜中操作以下步骤:

- a) 称取 100 mg 样品材料并迅速转移至用液氮预冷的研钵中,用研杵快速研磨组织,其间不断加入液氮,直至研磨成粉末状;
- b) 将研磨成粉末状的样品(50 mg~100 mg)加入含有 450 μL 裂解液的 1.5 mL 灭菌离心管中,用移液器反复吹打直至裂解液中无明显沉淀;
- c) 裂解液在 12 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 5 min 后,将上清液小心吸收到新的 1.5 mL 灭菌离心管中;
- d) 加入 c) 步骤所吸取上清液 1/2 体积的无水乙醇,用移液枪将溶液混合均匀;
- e) 立即将混合液(含沉淀)全部转入 RNA 提取吸附柱中,吸附柱放入收集管中;
- f) 12 000 r/min,离心 1 min,弃滤液;
- g) 将 500 μL 的去蛋白液加入至 RNA 提取吸附柱中,12 000 r/min 离心 30 s,弃滤液;
- h) 将 600 μL 的漂洗液加入至 RNA 提取吸附柱中,12 000 r/min 离心 30 s,弃滤液;
- i) 加入 500 μL 漂洗液,重复 1 遍;
- j) 将吸附柱放回空收集管中,12 000 r/min 离心 2 min,除去漂洗液;
- k) 取出吸附柱,放入一个无 RNase 的离心管中,在吸附膜的中间部位加 50 μL DEPC 处理的灭菌纯水,室温放置 5 min,12 000 r/min 离心 2 min;
- l) 离心得到的 RNA 溶液即为提取到的样品总 RNA。

10.1.2 总 RNA 提取质量的判定

RNA 质量可通过以下 2 种方法选择一种进行判定:

- a) 在超微量紫外可见分光光度计上测定样品总 RNA 的光吸收值,当 A260/A280 值在 1.8~2.0 时,判定提取的 RNA 质量符合 PCR 的扩增要求;
- b) 通过电泳和凝胶成像系统看条带的方法判定 RNA 质量及浓度,明显有 28S rRNA 和 18S rRNA 两条带且亮度高的,判定提取的 RNA 质量符合 PCR 的扩增要求。

10.2 实时荧光 PCR 扩增

10.2.1 实时荧光 PCR 检测体系

所有操作在超净工作台上进行,取出实时荧光 PCR 反应所需试剂,冰上融化后,根据检测样品的数量配制实时荧光 PCR 扩增反应液,每个检测样本反应混合液配制见表 1。

表 1 单个检测样品实时荧光 PCR 扩增反应混合液配制的组分及使用量

试剂	使用量, μL	20 μL 反应体系终浓度
2 \times One Step RT-PCR Buffer III	10.0	1 \times
Ex Taq HS(5 U/ μL)	0.4	0.1 U/ μL
PrimeScript RT Enzyme Mix II	0.4	
10 $\mu\text{mol/L}$ cp-qrt F	0.4	0.2 $\mu\text{mol/L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ cp-qrt R	0.4	0.2 $\mu\text{mol/L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ cp-probe	0.8	0.4 $\mu\text{mol/L}$
提取的样品 RNA 模板或对照(20 ng/ μL)	2.0	2 ng/ μL
一级水	5.6	
总体积	20	

10.2.2 实时荧光 PCR 反应

具体实时荧光 PCR 反应程序为:

- a) 反转录反应:42 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s
- b) PCR 反应:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,40 个循环。
- c) 将实时荧光 PCR 反应管放入荧光 PCR 检测仪内,得到检测样品 C_t 值,根据收集的荧光曲线和 C_t 值判定结果。

10.2.3 阈值设定

阈值设定原则根据仪器噪音情况进行调整,或以阈值线刚好超过正常阴性对照扩增曲线的最高点,结果显示为阴性来调整。

11 结果判定

11.1 有效判定原则

阳性对照的 C_t 值应 ≤ 30.0 ,并出现典型的扩增曲线,此时的阴性对照和空白对照应无 C_t 值,则判定结果有效。否则,判定此次结果无效,应重新进行检测。典型的实时荧光 PCR 扩增曲线见附录 B。

11.2 检测结果判定

11.2.1 阳性:阳性对照有扩增,阴性对照和空白对照无扩增,待检测样品有扩增且 C_t 值 ≤ 30 ,判定该样品检出香石竹斑驳病毒。

11.2.2 阴性:阳性对照有扩增,阴性对照和空白对照无扩增,待检测样品有扩增且 C_t 值 ≥ 35 ,判定该样品检出香石竹斑驳病毒。

11.2.3 临界值判定:阳性对照有扩增,阴性对照和空白对照无扩增,待检测样品 C_t 值在 $30\sim 35$,则需再次试验。若重复实验的结果出现典型的扩增曲线,检测 C_t 值仍然在 $30\sim 35$,则判定样品检出香石竹斑驳病毒;若重新测试的 C_t 值 ≥ 35 ,则判定该样品中未检出香石竹斑驳病毒;若重新测试的 C_t 值 ≤ 30 ,则判定该样品检出香石竹斑驳病毒。

附录 A

(资料性)

香石竹斑驳病毒的基本信息

A.1 病毒粒体形态特征

CarMV 的病毒粒子为等轴对称二十面体的球状,直径约 30 nm,沉降系数为 120 S~130 S,无包膜,表面粗糙,有 180 个蛋白结构亚基。其相对分子量为 8.2×10^6 ,钝化温度为 80 °C,稀释限点为 $10^{-6} \sim 10^{-5}$,体外存活时间可达 395 d。观察病叶的超薄切片,可看到木质部导管中有晶状排列或散生的病毒粒子,而细胞质中病毒排列在鞘状膜的结构中。

A.2 基因组信息

CarMV 全长为 4003 nt(Genbank: AF1922772)。RNA 为线性单链正义 RNA,共编码 5 个 ORF。RNA 的 3'端无 Poly(A),5'端有一个甲基化的核苷酸帽子结构。

A.3 寄主范围

自然寄主主要是石竹科 (*Caryophyllaceae*) 植物,其中香石竹 (*Dianthus caryophyllus*) 为其天然宿主。

实验寄主包括中国石竹 (*Dianthus chinensis*)、美国石竹 (*Dianthus barbatus*)、烟草 (*Nicotiana tabacum*)、高雪轮 (*Silene armeria*)、苋色藜 (*Chenopodium amaranticolor*)、昆诺藜 (*Chenopodium quinoa*)、墙生藜 (*Chenopodium murale*)、菠菜 (*Spinacia oleracea*)、番茄 (*Lycopersicon esculentum*)、千日红 (*Gomphrena globosa*)、番杏 (*Tetragonia tetragonioides*) 等多种植物。

A.4 香石竹斑驳病毒侵染香石竹的症状

侵染香石竹后主要表现为植株矮化、畸形、花叶、坏死、花朵变小或杂色、花苞开裂、生长衰弱等症状。

A.5 传播途径

该病毒主要通过汁液摩擦传播,生产中带毒母株繁殖为主要的传播途径。

附录 B
(资料性)

典型的实时荧光 PCR 扩增曲线

典型的实时荧光 PCR 扩增曲线见图 B.1, 其中检测样品 1 为检出香石竹斑驳病毒, 检测样品 2 为未检出香石竹斑驳病毒。

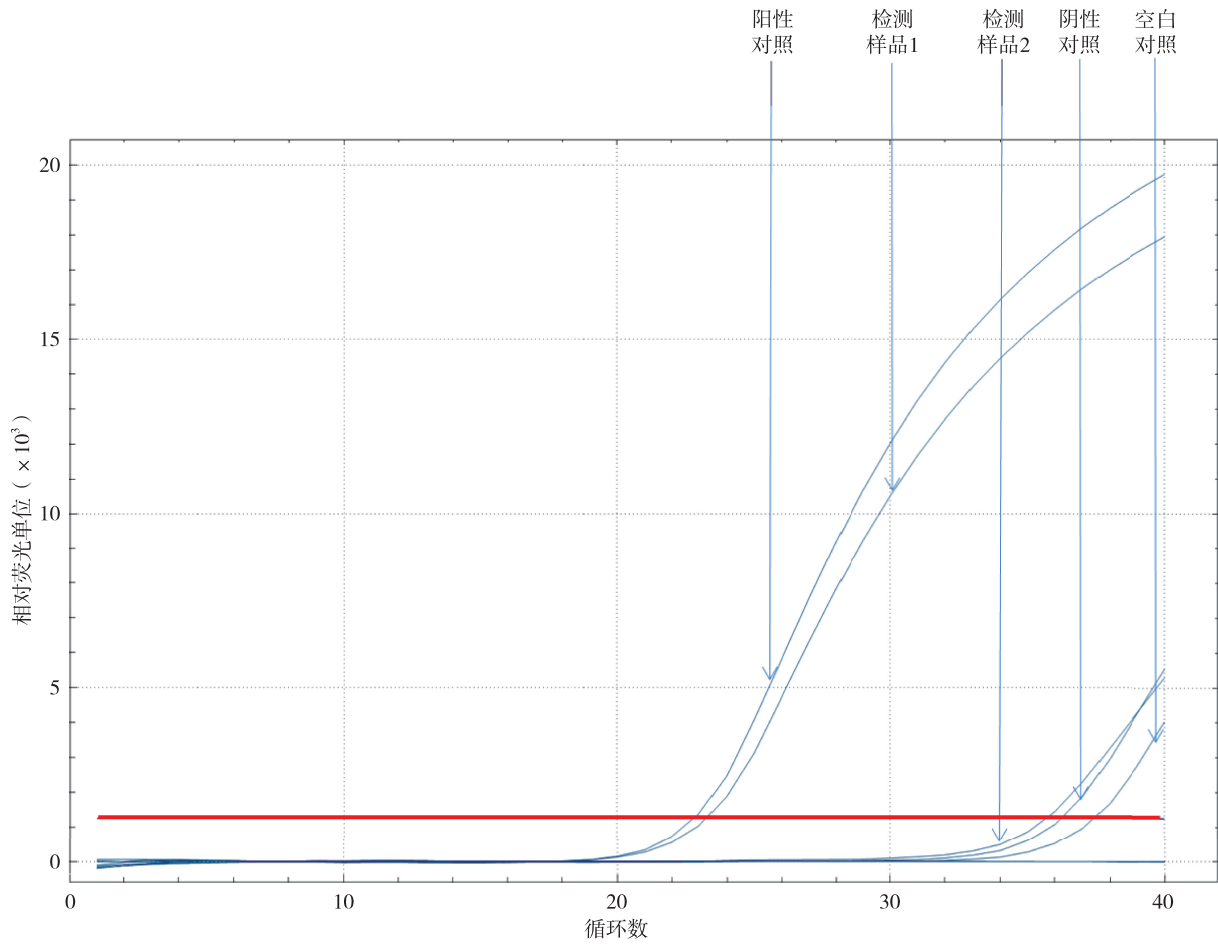


图 B.1 典型的实时荧光 PCR 扩增曲线